

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

総括研究報告書

輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性と安定供給を確保するための
新興・再興感染症の研究の開発

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

1. フラビウイルスを検出できる共通プライマーを開発し、1～4型のデングウイルス、チクングニアウイルス、ウスツウイルスを検出できることを確認した。
2. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの高感度核酸増幅法を開発し、特異性や感度を評価した。最終的に3セットのプライマーとプローブのセットを作成し、感度や特異性に問題がないことを確認出来た。
3. HBV の培養系と感染性の評価方法を改良し、HBV 陽性血漿を用いて HBV の液状加熱による不活化効果と抗 HBs グロブリン製剤の中和活性ができるようになった。
4. SARS-COV2 の武漢株、イギリス型変異 (B. 1. 1. 7, D614G 変異)、ブラジル型変異 (P. 1, N501Y) を用いて、血漿分画製剤で用いる 60°C 液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることを確認した。血清にウイルスをスパイクしたところ、PBS にスパイクする場合と比較し感染性の低下が認められた。血液から RNAemia が見つかるにも関わらず感染性のあるウイルスが分離されないという報告との関連性
5. ダニ媒介のウイルスの感染リスクを減少させるため、渡り鳥の飛来地のマダニからウイルスの解析を行った。鳥を介してウイルスを保有したマダニが広い地域に点在していることを明らかに出来た。北陸地域の渡り鳥飛来地を中心としたダニ媒介ウイルスの調査において、当該地域のキチマダニから複数年に渡って Kabuto mountain virus (KAMV) が計 5 株分離されており、これら分離株の配列情報を活用して、プローブ法によるリアルタイム PCR に基づく高感度 KAMV 検出系を今回新たに確立した。
6. アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理による HEV の不活化効果を評価した。それぞれ対数減少率 (LRV) で 1Log、及び 2Log 程度であることが明らかとなり液状加熱処理は HEV に対しては有効な工程であることが判明した。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長

大隈 和 関西医科大学
教授

野島 清子 国立感染症研究所
主任研究官

比嘉 由紀子 国立感染症研究所
室長

前野 英毅 日本血液製剤機構
中央研究所 室長

A. 研究目的

ヒトや物質の国際的な移動の急速な増加や地球温暖化のためにデングウイルス やチクングニアウイルスなどの蚊媒介性ウイルス感染症が東南アジアや中南米諸国において流行し、毎年輸入感染例が報告されている。これらのウイルスを媒介する蚊が国内に存在しているため国内でも発生する可能性がある。また、新型コロナウイルスが中国で発生し、世界的なパンデミックとなっている。血液からのウイルス遺伝子が検出されたとの報告もあった。新興・再興感染症は血液製剤の安全性の脅威になるだけでなく、献血者の減少を招き安定供給に重大な支障をきたす。更に E 型肝炎ウイルス(HEV)に加えて重症熱性血小板減少症やダニ媒介脳炎などダニ媒介のウイルス感染症も広く国内に存在していることも明らかになっている。これらの病原体は、いずれもウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある

る。一方、血液製剤の安全対策上重要な B 型肝炎ウイルスは、適当な培養系が開発されていないために不活化法の評価には動物由来のモデルウイルスが使用されている。本研究班では、これらの病原体を検出する検査法の開発と標準化、スクリーニング法の開発とその評価を行う。また、新規病原体であるコロナウイルスが血中からも検出されることから輸血製剤や血漿分画製剤におけるリスクの評価も目指した。

B. 研究方法と結果

1) 血液製剤の安全性を確保するための蚊媒介性ウイルスのウイルス学的特性の解析

これまでに開発したデングウイルス、ウエストナイルウイルスを含むフラビウイルス共通プライマーを用いた迅速診断法のデング患者検体に対する反応性を検討したところ、デング 1 型から 4 型までの検体中のウイルス遺伝子を検出することを確認した。また本共通プライマーは

アフリカ型の遺伝子型であるジカウイルス MR766 株およびアジア型である PRVABC59 株も検出した。またウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株や Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株も検出することが確認されたのでこの 2 株を用いて USUV の細胞培養系の整備および USUV の遺伝子検出系の整備を行った。

2) 血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

研究要旨:血液製剤は、ヒトの血液を原料とすることからウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。そのため血液製剤の安全性を担保する上で、血液への病原体の混入をいち早く検出、防止し製造過程より病原体を排除することは極めて重要な課題である。近年我が国ではデングウイルスの国内感染例の発生や海外での重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) の同定に伴う国内感染例の確認等がなされ、国際的な人の移動や新たな病原体の発見等に伴う新興・再興感染症病原体の献血血液等への混入リスクは益々認知されている。そこで本研究では、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献することを目的に、既に国内感染が認められ献血血液等におけるスクリーニング法の整備が急がれる SFTSV の高感度核酸検査法の確立を目指す。本年度はこれまでに同定したプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム RT-PCR 法のマルチプレックス化に向けた検討を行った。S

3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

昨年度に親株より HBV に対して 10~20 倍高感受性を示す 2 つのクローン株を得た。HBV 感染後にポリエチレングリコールと DMSO を添加して培養し、2 週目と 4 週目に細胞内の HBV-DNA を定量することで 4 週目の方が HBV-DNA 量が増加している場合に感染性ありとした。2 つの約 5×10^8 IU/mL の HBV 陽性血漿を用いて 5% アルブミン製剤での 60°C-10 時間の液状加熱による HBV 不活化効果を検討し、4Log 以上不活化されることが明らかとなった。また、10 感染価と 100 感染価の HBV を調整し、0.03~3IU に希釈した抗 HBs 免疫グロブリンと 37°C で 2 時間中和させたところ、200IU (筋注用抗 HBs 免疫グロブリン 1 本) の製剤で約 6.7×10^4 感染価の HBV の中和が可能であった。HBV 陽性血漿を用いて実際の HBV の液状加熱による不活化や中和活性を測定が可能であった。

4) 実ウイルスを用いたエタノール分画法による血漿の分画とウイルスの不活化・除去と安全性の評価

SARS-CoV-2 感染症の知見としては、症状のある感染者の 15%において血液中から SARS-COV-2 の RNA が検出される (RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワ

クチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性などを明らかにした。血漿分画製剤の原料血漿に混入した場合の安全性を評価するために武漢株、アルファ型変株、ベータ型変異ウイルス株、ガンマ型変異ウイルス株、デルタ型変異ウイルス株、オミクロン型変異ウイルス株等を血漿分画製剤で用いる 60℃液上加熱処理した。この不活化法によって全てのウイルス株が 30 分で不活化されることが確認できた。原料血漿に混入した場合に液状加熱や界面活性剤処理、20nm のウイルス除去膜によるウイルス除去等の工程が複数組み合わされていることから血漿分画製剤の安全性は高いと考えられた。また、血清中に抗体や補体以外の感染性を抑制する因子の存在を示唆する結果も得られた。

5) マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

マダニ媒介感染症の予防には、マダニの生態や生理的な知見を得ることが重要であるが、野外における情報は限られている。主に大型の哺乳動物がマダニの重要な吸血源となるため、その移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられている。一方で、鳥類に寄生するマダニが海外から運

ばれる可能性も指摘されていることから、本研究では渡り鳥の飛来地に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。2021 年は、これまで得られた植生マダニのサンプルを用いて、吸血源動物の探索、ウイルス検出と検査系の確立を中心に研究を進めた。マダニ媒介ウイルスの自然界における感染環を考える際、吸血源動物の特定が重要である。本研究では、植生マダニ（動物に咬着しておらず、マダニ体内に血液成分もほとんど認められないため吸血源動物を特定することが困難）に対して、RLB (Reverse Line Blot 法) と NGS (Next Generation Sequencing) を併用することで、体内にわずかに残る血液成分から様々な分類群に属する吸血源動物を種レベルで同定する検出系を構築した。ヒト刺咬例が多く、植生マダニの優占種であるキチマダニについて解析したところ、北陸の渡り鳥飛来地 4 地点すべてから鳥類を吸血した個体が検出された。また、コジュケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、サルの DNA 断片が検出され、これらの動物を吸血していることが示唆された。これまで北陸地域の渡り鳥飛来地を中心としたダニ媒介ウイルスの調査において、当該地域のキチマダニから複数年に渡って Kabuto mountain virus (KAMV) が計 5 株分離されており、これら分離株の配列情報を活用して、プローブ法によるリアルタイム PCR に基づく高

感度 KAMV 検出系を今回新たに確立した。

6) 感染症のE型肝炎ウイルスの不活化に関する研究

E型肝炎ウイルス（以下、HEV）に対する血漿分画製剤のさらなる安全性の向上を目指し、HEVの熱感受性の調査、及び新たにヒトへの感染が報告された動物種由来HEVのリスク評価を実施した。

HEVの熱感受性の調査については、リバーシジェネティクス法により培養細胞から産生したHEV（以下、RG-HEV）を用いて、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理（60℃、10時間）での不活化効果を評価した。その結果、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の不活化効果はそれぞれ、1 Log reduction value（以下、LRV）、及び2 LRV程度であることが明らかとなった。これらの結果はヒト血液由来のHEVを用いた実験結果とも類似しており、液状加熱処理におけるRG-HEVのモデルウイルスとしての適正の一端を示唆するものである。また、これらの結果から、液状加熱処理はHEVに対して有効な工程ではないものの、ウイルス除去膜処理による除去効果と併せることで、HEVに対する安全性の向上に寄与し得ると考えられた。

動物種由来HEVのリスク評価については、新たにヒトへの感染が報告されたウサギ、及びラットHEVの2種類について実施した。ウサギHEVは、これまでヒトへの感染の報告がある動物種（イノシシ、シカ、ブタ）のHEVと遺伝学的に近縁であり、構造タンパク質の相同性も高いこ

とから、これまで対象としてきたHEVと同様、NATによる検出やウイルス除去・不活化処理は有効に機能する可能性が高いと考えられた。一方、ラットHEVについては、これまで報告のあるHEVと異なる遺伝子型に分類されるためNATをすり抜ける可能性が高いものの、粒子サイズは他のHEVと変わらないことから、ウイルス除去膜は有効に機能すると考えられた。総じて、新たな動物種由来のHEVに対して、注視は必要なものの血漿分画製剤のウイルス安全性に対する追加の施策は必要ないと考察した。

D. 考察

中国で発生したSARS-COV-2の世界的なパンデミックによって国内外のヒトの移動は激減したが、これまで問題になっていた感染症が減少したわけではない。新型コロナウイルスは血中から検出される頻度が低いことや検出されても低濃度であることから発症前の供血者からの血液製剤で感染する可能性は少ないと考えられているが、本研究班は、新興・再興感染症が発生した場合に血液製剤へのリスクが予想される際には、すぐに対応できる感染症の各分野からの研究者から構成されている。今回も原料血漿に新型コロナウイルスが混入した場合の製剤の安全性を確認するために液状加熱による感受性を評価した。その一方で、国内に既に常在している病原体やそのベクターも放棄された農地などの拡大や野生動物の増加、更には温暖化等の要因などによって生存する地域が

拡大し、従来よりもヒトが感染し易くなる可能性もある。このような状況の中で流行が生ずる前に病原体の性状や検出法の開発、さらには発生時の対応法を検討しておくことは、血液製剤の安全性確保や安定供給に重要である。また、B型やC型肝炎ウイルスは感染系がなく、そのためにモデルウイルスを用いて安全性の評価を行なっている。HEVも *in vitro* の感染系はあるものの、安全性試験に必要な高力価の感染性を有する血漿ウイルスを十分に得ることは困難であった。この研究班では、効率的な培養系を確立するために分子生物学的手法を取り入れ高力価のウイルスを作成することに成功した。これまでのウイルス除去膜による除去に加えて今年度はアンチトロンビン製剤と免疫グロブリン製剤のHEVに対する液状加熱による不活化を検討し、効果的な方法でないことを明らかにした。これらはより安全な血漿分画製剤の製造に貢献すると考えられた。

E. 結論

新興・再興感染症等の脅威から血液製剤の安全性確保と安定供給のために蚊媒介ウイルス、SFTSウイルス等の検出法の開発を行った。ダニ媒介感染症の予防のためにダニの吸血源の解析や渡り鳥の飛来地でのダニの調査を行なった。

また、分画製剤の安全性の評価のためにHBVやHEVの不活化に加え新型コロナウイルスの不活化を検討した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 岡田義昭、野島清子、血液製剤の安全性向上を目指したB型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系の開発、第69回日本輸血・細胞治療学会総会、2021年 東京

2) 山麻衣子、鈴木雅之、玉栄建次、内野富美子、加藤由佳、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭、輸血副反応報告の実態調査とその重要性の啓発活動、第69回日本輸血・細胞治療学会総会、2021年 東京

3) 岡田義昭、野島清子、Parvovirus B19 培養系の開発、第69回日本ウイルス学会総会、2021年 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし